Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 277- 293

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۹۳-۲۷۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Optimization of subcritical water fluid extraction of phenolic compounds from pistachio hull: evaluation of radical scavenging properties of extracts

Morteza Mohammadi[1*], Mohammad Ghorbani[2], Alireza Sadeghi-Mahonak[2], Adel Beigbabaie[3], Samira Yeganehzad[4]

Received: 2021.01.18
Accepted: 2021.05.16

How to cite this article:
Mohammadi, M., Ghorbani, M., Sadeghi-Mahonak, A., Beigbabaie, A., Yeganehzad, S. (2022). Optimization of subcritical water fluid extraction of phenolic compounds from pistachio hull: evaluation of radical scavenging properties of extracts. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 277-293.

Abstract

Introduction: Phenolic compounds are known as a base of many functional foods due to their antioxidant properties and salutary effects. Phenolic compounds mainly found in plant sources. Agricultural wastes are one of the cheapest sources for getting phenolic compounds. Pistachio is considered one of the most important agricultural products in Iran. Study on the different parts of solid wastes generated from pistachio processing is worthy due to containing valuable compounds. On the other hand, using novel techniques such as supercritical CO_2, subcritical water, pulsed electric fields, etc., have gained more attention in the past few years. These technologies do not have side effects on the raw materials and final products; do not use chemical solvents such as hexane, methanol, acetonitrile, etc., in comparison to traditional extraction methods with the long time needed and using chemical solvents with hazardous effect on consumers. In this study, the subcritical water extraction method as a green technology was used for the extraction of phenolic compounds from pistachio hull using y response surface methodology.

Materials and Methods: In this study antioxidant properties of phenolic compounds extracted from pistachio hull by subcritical water fluid were evaluated. The extraction process is done at 120– 180 Celsius degree, pressure 10– 50 bar and ratio 1:10– 1:30 (sample to solvent) by using the subcritical water fluid method. The total phenolic compound, flavonoid compounds, reduction power, radical scavenging, and stability power of soybean edible oil were determined for each treatment. The stability power of extracts in soybean measured with rancimat test at 110 Celsius degree and airflow of 20 litter per minute. Comparison and statistical analysis for optimization of results accomplished using response surface methodology (RSM) by design expert software 7.0.0 version. After optimization, the results for optimum treatment were compared with BHT, ascorbic acid, and alpha-tocopherol. This comparison was done for reduction power, stability power, and radical scavenging ability.

Results and Discussion: The results showed that the total phenolic compounds changed from 7671.43 to 8903.57 mg Gallic acid equivalent per 100 g dry matter. Reduction power increased by increasing temperature from 120 to 150 Celsius degree and after that decreased. The effect of pressure on the phenolic compounds wasn't remarkable. The amount of flavonoid compound was between 142.87 and 290.21 mg equivalent catechin per 100 g dry material. The most effective parameter among investigated parameters (temperature, pressure, and ratio), was temperature. The pressure of extraction in subcritical water extractions did not have any significant effect and every change in laboratory results was very small.

---

1. Ph.D. Student of Food chemistry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
2. Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Assistant Professor, Food Chemistry Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST).
4. Assistant Professor, Food Processing Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST).
(*Corresponding Author Email: mohamadi2003@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68332.1009

The best results were observed at 147 Celsius degrees, pressure 10 bar, and 1:19 ratio. In these optimum conditions, the amount of total phenolic compounds, total flavonoid compounds, stability power, radical scavenging power, and reduction power was 2497.8 mg gallic acid per 100 g dry material, 267.99 mg flavonoid compounds catechin equivalent per 100 g dry material, 7.44 h, 1370.77 ppm, and 362.94 ppm respectively. Reduction and stability power with radical scavenging ability of pistachio hull extracts were very near to BHT as well as a synthetic antioxidant. Results showed that the extracts obtained from pistachio hull by subcritical water had high amount of phenolic compounds and had the same antioxidant properties as the synthetic antioxidant BHT.

Keyword: Subcritical water, Pistachio Hull, Novel technologies, agricultural wastes, flavonoid compounds, stability power.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 277- 293

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۹۳-۲۷۷

مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی کاربرد سیال مادون بحرانی آب در فرآیند استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از پوست پسته و بررسی ویژگی‌های رادیکال گیرندگی عصاره‌های آن

مرتضی محمدی[1]*- محمد قربانی[2]- علیرضا صادقی ماهونک[2]- عادل بیگ بابائی[3]- سمیرا یگانه‌زاد[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

چکیده

ترکیبات فنولی به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و اثرات سلامتی‌بخش بر سلامتی انسان به‌عنوان غذاهای فراویژه شناخته شده‌اند. در این پژوهش ترکیبات فنولی با استفاده از سیال مادون بحرانی آب، از پوست پسته استخراج و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. فرآیند استخراج در دمای ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، تحت فشارهای ۱۰ تا ۵۰ بار و نسبت اختلاط حلال ۱:۱۰ تا ۱:۳۰ (حلال به نمونه)، با استفاده از سیال مادون بحرانی آب انجام شد. مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و قدرت پایدارکنندگی در روغن سویا برای عصارهای استخراجی اندازه‌گیری شد. قدرت پایدارکنندگی عصاره‌ها در روغن سویا و با استفاده از آزمون اندازه‌گیری پایداری حرارتی، در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت صورت گرفت. مقایسه و تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از روش سطح پاسخ انجام گردید. نتایج نشان داد که مقدار ترکیبات فنولی از ۷۶۷۱/۴۳ تا ۸۹۰۳/۵۷ میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه در تغییر بود. قدرت احیاکنندگی از دمای ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و اثر فشار بر ترکیبات فنولی عصاره‌ها قابل توجه نبود. بهترین نتیجه در شرایط دمایی ۱۴۳ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۱۲ به‌دست آمد. قدرت احیاکنندگی آهن، قدرت پایدارکنندگی و جذب رادیکال‌های آزاد عصاره‌های استخراجی از پوست پسته مشابهت زیادی با آنتی اکسیدان سنتزی BHT داشت. نتایج حاکی از آن بود که کاربرد آب مادون بحرانی در استخراج ترکیبات موثره از پوست پسته تاثیر معنی‌داری در افزایش راندمان استخراج داشت و عصاره‌های استخراجی در مقایسه با روش سنتی از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: آب مادون بحرانی، پوست پسته، روش‌های نوین استخراج، ضایعات کشاورزی، ترکیبات فلاونوئیدی، پایدارسازی روغن خوراکی.

مقدمه

اکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی، نگهداری آن‌ها را شدیدا کاهش داده و باعث می‌شود غذاهایی با کیفیت غیرقابل قبول به مشتری ارائه شود. پژوهش‌های زیادی برای یافتن پتانسیل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌دست آمده از مواد مختلف کشاورزی (مانند پوست، ریشه، ساقه، برگ و میوه گیاهان) به‌عنوان جایگزینی برای ترکیبات سنتزی انجام شده است (Mohammadi *et al*., 2019). تحقیق‌های انجام شده در این خصوص نشان داده است که ترکیبات پلی‌فنولی، آنتی اکسیدان‌های خوبی در برابر اکسیداسیون اولیه چربی‌ها در فسفولیپیدها و سیستم‌های بیولوژیکی هستند (Braud *et al*., 2017). این موضوع عموما پذیرفته شده که تنش اکسایشی به‌وسیله گروه‌های مختلف اکسیژن فعال شده (ROS)[5] مانند رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و متوکسیل، ایجاد می‌شود (Akhtar *et al*., 2017).

یکی از محصولات کشاورزی استراتژیک ایران، پسته می‌باشد که در مقیاس بسیار وسیعی در مناطق مختلف ایران کشت و کار می‌شود، به‌گونه‌ای که ایران با تولید ۲۱۰ هزار تن پسته طی سال آبی ۲۰۱۵ -۲۰۱۴، همچون سال‌های قبل از آن، بزرگترین تولیدکننده این محصول در سطح دنیا بوده است (USDA, 2015). Rajaei و همکاران

۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۲- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳- استادیار، گروه شیمی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، کیلومتر ۱۲ جاده قوچان، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی
۴- استادیار، گروه فراوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، کیلومتر ۱۲ جاده قوچان، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی
(* - نویسنده مسئول: Email: mohamadi2003@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68332.1009
5 Reactive Oxygen Species (ROS)

(۲۰۱۰) بیان نمودند که ترکیبات استخراج شده از پوست پسته دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی خوبی می‌باشد (Rajaei *et al*., 2010).

تاکنون استفاده از حلال‌های آلی بیشترین دامنه کاربرد را در استخراج ترکیبات موثره از منابع طبیعی داشته است. اما روش‌های معمول استخراج بر پایه حلال‌های آلی ممکن است اثرات نامطلوبی بر محیط زیست و مواد غذایی داشته باشد. از این‌رو اخیرا تکنولوژی سبز مورد توجه قرار گرفته است. استخراج به‌وسیله سیال مادون بحرانی[1] (SCW) به‌عنوان یک روش استخراج، از آب به‌عنوان حلال، استفاده می‌کند. تحت شرایط مادون بحرانی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب تغییر کرده و قابلیت آن برای استخراج مجموعه‌ای از ترکیبات زیست فعال افزایش می‌یابد (Al-Dabbas *et al*., 2006). آب در محدوده دمایی ۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتی‌گراد و تحت فشار مورد نیاز برای باقیماندن در فاز مایع، به یک سیال مادون بحرانی تبدیل می‌شود (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al*., 2016). تحت این شرایط باندهای هیدروژنی ضعیف و سست شده، قطبیت آب به مقدار قابل توجهی کاهش یافته و ثابت یونیزاسیون آب (K_w) افزایش می‌یابد (Ayala and Luke, 2001; Tilahun and Chun, 2017). Ahmadian-Kouchaksaraie و همکاران (۲۰۱۶)، ترکیبات فنولی موجود در گلبرگ زعفران را توسط آب مادون بحرانی استخراج نمودند (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al*., 2016). Maghsoudlou و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند روش استخراج توسط آب مادون بحرانی در مقایسه با امواج فراصوت دارای قابلیت بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها از انجیر می‌باشد (Maghsoudlou *et al*., 2016).

با توجه به اینکه پسته تازه برداشت شده، حدودا دارای ۲۰٪ پوست می‌باشد که پس از برداشت به‌وسیله ماشین‌های پوست‌کن از آن جدا شده و در اغلب موارد دور ریخته شده و در معدود مواردی نیز به مصرف خوراک دام می‌رسد، به‌نظر می‌رسد که مطالعه روی میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و زیست‌فعال این بخش از محصول پسته می‌تواند افق‌های جدیدی را در تولید و بهره برداری بیشتر در مورد پسته ایجاد نماید. هدف از انجام این پژوهش اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی و بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده از پوست پسته و بهینه‌سازی فرآیند استخراج تحت شرایط مادون بحرانی، به‌منظور رسیدن به عصاره‌ای با بیشترین مقدار ترکیبات فنولی کل، حداکثر قدرت رادیکال گیرندگی، احیاکنندگی و پایدارکنندگی روغن سویا بود.

مواد و روش‌ها

آزمایشات در آزمایشگاه فناوری‌های نوین موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی و در سال ۲۰۲۲ انجام شد. با توجه به اینکه محصول پسته از ابتدای مرداد ماه تا پایان مهر ماه برداشت می‌شود، پوست پسته از باغات استان خراسان رضوی، شهرستان سبزوار، تهیه شد. روغن سویای فاقد آنتی‌اکسیدان از شرکت سه گل نیشابور تهیه و سایر مواد اولیه و معرف‌های شیمیایی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

خشک کردن پوست پسته

پوست‌های پسته تازه جمع‌آوری شده و به‌صورت سایه- خشک، خشک و تا زمان مصرف نگهداری گردید. پس از آن پوست‌های پسته، توسط آسیاب آزمایشگاهی (T- 8300، ایران) کاملا خرد و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (Mohammadi et al., 2019).

عصاره‌گیری

مقدار مورد نیاز توسط ترازوی آزمایشگاهی (A&D، N92 D0001، ژاپن) با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و درون توری‌هایی از جنس استیل با مش ۱۰۰۰ ریخته و کاملا بسته و درون مخزن دستگاه قرار داده شد. حجم مورد نیاز از حلال با توجه به نسبت اختلاط، درون مخزن ذخیره دستگاه[2] ریخته و هیتر دستگاه برای تامین درجه حرارت مورد نیاز روشن شد. همزمان پمپ فشار بالا نیز روشن و روی فشارهای مورد نیاز تنظیم گردید. عصاره‌گیری از پوست پسته در دماهای ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، فشارهای ۱۰ تا ۵۰ بار و نسبت اختلاط‌های ۱:۱۰ تا ۱:۳۰ به‌وسیله دستگاه استخراج‌کننده مادون بحرانی آب طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فناوری‌های نوین موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی انجام شد.

بعد از اتمام استخراج، عصاره تهیه شده در اولین مرحله، توسط پارچه متقال و در مرحله دوم توسط کاغذ صافی و پمپ خلا (Buchi B-169، سوئیس) صاف شد. عصاره صاف شده ابتدا توسط تبخیرکننده دوار تحت خلا (Buchi B-480، سوئیس)، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد غلیظ و عصاره تغلیظ شده در آون خلا (Hearus، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. عصاره خشک شده از کف پلیت‌ها تراشیده و درون شیشه‌های دربدار که توسط فویل آلومینیومی در برابر نفوذ نور محافظت شده بودند، تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mohammadi et al., 2019).

1 Subcritical Water

2 Balance Tank

تعیین مقدار کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیوکالتو

غلظت مناسبی از عصاره‌های استخراجی تهیه و ۰/۵ میلی‌لیتر از آن‌ها به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰ بار رقیق شده در آب مقطر، به لوله‌ها منتقل و در نهایت ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در پایان جذب نمونه، در سل‌های یک سانتی‌متری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu160 A, UV-Visible Recording، ژاپن) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. برای نمونه شاهد از ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. آزمون برای هر نقطه با سه تکرار انجام شد. در پایان مقدار کل ترکیبات فنولی (TPC) بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه خشک پوست پسته محاسبه گردید (Kulisic *et al.*, 2004).

تعیین قدرت احیاکنندگی

۲/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به لوله‌های آزمایش دربدار منتقل و بعد از آن ۲/۵ میلی‌لیترمحلول بافر فسفات (pH= ۶/۶، ۰/۲ مولار) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد، به لوله‌ها اضافه و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه درون بن ماری (Memmert 350، آلمان) ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن بلافاصله در آب ۴ درجه سانتی‌گراد، خنک و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید، به لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ (Hettich–EBA 2، آلمان) ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفوژ شد. ۵ میلی لیتر از محلول بالایی توسط ۵ میلی لیتر آب مقطر رقیق و پس از آن ۱ میلی لیتر محلول فریک کلراید ۰/۱ درصد به لوله اضافه و تکان داده شد و در پایان جذب آن در ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. این آزمایش با سه تکرار انجام شد (Maghsoudlou *et al.*, 2016). برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی (RP)، از مقدار عددی EC_{50}[1] که برابر است با غلظت مورد نیاز برای به‌دست آمدن جذب ۵۰ درصد، استفاده شد. هرچه مقدار EC_{50} کمتر باشد، نشان از قدرت بیشتر عصاره در احیا آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی می‌باشد. از BHT و اسید آسکوربیک به‌عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد.

آزمون پایدارکنندگی

به‌منظور پایداری اکسایشی روغن، از دستگاه رنسیمت (Metrohm 743، آمریکا) استفاده شد. در این روش از شرایط تشدید شده اکسایش مانند دمای بالا و جریان هوا استفاده می‌شود. روش کار به این صورت بود که غلظت ثابت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره‌ها در آب، به کمک ماده حد واسط پروپیلن گلایکول که در صنعت روغن به‌منظور توزیع BHT در روغن کاربرد دارد، در روغن سویای تصفیه، بوگیری و رنگبری شده بدون آنتی‌اکسیدان، تهیه و ۴ گرم از نمونه آماده شده به درون لوله‌های مخصوص دستگاه منتقل شد. پس از آن لوله‌ها در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با شدت جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت، درون دستگاه قرار گرفتند. زمان لازم، بر حسب ساعت، برای رسیدن روغن به شرایط اکسید شده تحت عنوان دوره القا[2] بیان گردید (Yang *et al.*, 2016). به‌منظور مقایسه بهتر از BHT به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سنتزی و آلفاتوکفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت پایداری روغن سویا استفاده شد.

اندازه‌گیری قدرت رادیکال گیرندگی

قدرت رادیکال‌گیرندگی (RSA) عصاره‌های استخراجی با استفاده از روش توصیف شده توسط Shaddel و همکاران (۲۰۱۴)، با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد (Shaddel *et al.*, 2014). در این روش ۰/۰۰۲ گرم از DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد به‌طوریکه جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ nm، بین ۰/۹ −۱ باشد. ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی به همراه ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH به لوله‌های آزمایش منتقل و پس از ۳۰ دقیقه، جذب محلول نهایی در طول موج ۵۱۷ nm قرائت گردید. از متانول به‌عنوان شاهد استفاده شد. جذب‌های به‌دست آمده با استفاده از رابطه ۱ به درصد توانایی جذب رادیکال[3] تبدیل و در ترسیم منحنی‌های رادیکال گیرندگی استفاده شدند.

$$RSA\% = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \qquad (۱)$$

که در آن $Abs_{control}$ جذب نمونه شاهد و Abs_{sample} جذب نمونه می‌باشد. برای مقایسه قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی، از فاکتور IC_{50} که برابر است با غلظت موثر برای جذب ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط، استفاده شد. برای مقایسه بهتر از BHT و اسید آسکوربیک بهره گرفته شد.

اندازه‌گیری محتوای کل فلاونوئیدی

اندازه‌گیری محتوای کل فلاونوئیدی بر اساس ایجاد ترکیبات رنگی آلومینیوم کلراید در حضور ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. یک گرم از پوست پسته پودر شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی شده توسط HCl (۱ درصد V/V) مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ

1 Efficient Concentration
2 Induction Period
3 Radical Scavenging Ability (RSA %)

و محلول بالایی در روش رنگ‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از محلول با ۴ میلی‌لیتر با رقیق و با ۰/۳ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد $NaNO_2$ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق باقیماند. پس از آن ۰/۶ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید (III) ۶ آبه ($AlCl_3.6H_2O$) به محلول اضافه و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق ماندن، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۱ مولار NaOH به آن اضافه و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. جذب محلول نهایی در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت و نتایج با استفاده از نمودار استاندارد بر مبنای میلی‌گرم کاتچین در ۱۰۰ گرم ماده خشک بیان شد (Talebi et al., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بهینه‌سازی فرآیند استخراج عصاره از پوست پسته، به‌وسیله سیال مادون بحرانی آب با روش سطح پاسخ، بر پایه طرح مرکب مرکزی با سه فاکتور، که از بیست آزمایش با شش نقطه مرکزی تشکیل شده بود، صورت گرفت. متغیرهای مستقل عبارت بودند از دمای استخراج (x_1, °C)، فشار (x_2, bar) و نسبت اختلاط نمونه و حلال (x_3). طراحی آزمایش‌ها و آنالیز واریانس به‌وسیله نرم افزار Design Expert نسخه ۷ در سطح احتمال α=۰/۰۵ انجام شد. علاوه بر آن رفتار متغیرهای مورد مطالعه در این تحقیق، با توجه به مدل‌های برازش داده شده، در جهت رسیدن به بهترین شرایط مورد نظر، بهینه‌سازی شدند.

نتایج و بحث

انتخاب مدل نتایج به‌دست آمده

مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی روغن و قدرت رادیکال گیرندگی، در برازش داده‌ها نسبت به سایر مدل‌های پیشنهادی، اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱- انتخاب مدل برای مقادیر ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌های استخراجی

Table 1- Model selection for the TPC, reducing power, stability power, radical scavenging ability, and total flavonoid compounds of extracts

	منبع Source	عرض از مبدا	خطی	چندجمله‌ای ساده	چندجمله‌ای درجه دوم	چندجمله‌ای درجه سوم	کل	باقیمانده	باقیمانده
		مدل							
	درجه آزادی	1	3	3	3	4	20	6	6
ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	مجموع مربعات	1.06×10^8	1883933	172893.1	172077.8	17637.93	1.09×10^8	17040.9	17040.9
	F Value		26.46556	3.6236	16.54014	1.552553			
	p-value		< 0.0001	0.0424	0.0003	0.2997			
قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	مجموع مربعات	2254824	7376.078	696.9947	10850.03	713.4411	2274817	357.3506	357.3506
	F Value		3.117742	0.253364	33.77572	2.994711			
	p-value		0.0555	0.8576	< 0.0001	0.1115			
قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	مجموع مربعات	959.251	11.76738	0.686138	0.224725	0.13802	972.3817	0.314433	0.314433
	F Value		46.03438	4.390669	1.655607	0.658424			
	p-value		< 0.0001	0.0242	0.2387	0.6428			
قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	مجموع مربعات	2.09×10^7	1694809	430198.7	497793.9	8740.013	1.51×10^8	4150.267	4150.267
	F Value		9.606916	3.650386	128.7259	3.158838			
	p-value		0.0007	0.0416	< 0.0001	0.1013			
فلاونوئیدهای کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)	مجموع مربعات	9.31×10^5	5224.40	2909.86	10333.43	4861.97	9.58×10^5	3336.34	3336.34
	F Value		1.30	0.68	4.20	2.19			
	p-value		0.31	0.58	0.04	0.19			

جدول ۲- آنالیز واریانس پارامترهای ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌های استخراجی (ANOVA).

Table 2- Analysis of variance of the parameters of TPC, reducing power, stability power, radical scavenging ability, and total flavonoid compounds of extracts (ANOVA)

	منبع	عرض از مبدا	دما-A	فشار-B	نسبت -C اختلاط	AB	AC	BC	A^2	B^2	C^2	باقیمانده	فقدان برازش	خطای خالص
	درجه آزادی	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	5	5
ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	مجموع مربعات	2228904	95329.56	7562.5	1781041	-	-	166340.9	44135.24	129110.7	53342.73	34678.83	22615.97	12062.85
	F Value	71.41418	27.48927	2.180725	513.5817	-	-	47.96612	12.72685	37.23042	15.38193		1.874844	
	p-value	< 0.0001	0.0004	0.1705	< 0.0001	ns	ns	< 0.0001	0.0051	0.0001	0.0029		0.2535	
قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	مجموع مربعات	18923.1	4645.643	1352.912	1377.523	-	649.1489	-	9800.94	193.573	4394.258	1070.792	724.7604	346.0313
	F Value	19.63563	43.38512	12.63469	12.86453	-	6.062326	-	91.52985	1.807756	41.03747		2.094494	
	p-value	< 0.0001	< 0.0001	0.0052	0.0050	ns	0.0336	ns	< 0.0001	0.2085	< 0.0001		0.2182	
قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	مجموع مربعات	13.33	9.84	1.35	1.27	-	0.08	0.15	0.41	0.26	-	0.12	0.05	0.07
	F Value	121.82	809.04	111.34	104.19	-	6.39	12.15	33.67	21.01	-		0.67	
	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	0.03	0.005	0.0002	0.001	ns		0.6614	
قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	مجموع مربعات	2622802	502206.2	404024.4	788578.6	88085.77	82799.24	259313.7	142632.2	160030	144135.1	12890.28	8771.991	4118.289
	F Value	226.0792	389.6007	313.4334	611.7622	68.33503	64.23386	201.17	110.651	124.1478	111.8169		2.130009	
	p-value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001		0.2131	
فلاونوئیدهای کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)	مجموع مربعات	18467.70	918.34	-	4019.62	–	–	–	4500.47	-	1781.75	8198.31	5015.35	3182.96
	F Value	2.50	1.12	-	4.90	–	–	–	5.49	-	2.17		1.58	
	p-value	<0.001	<0.001	ns	0.05	ns	ns	ns	0.04	ns	0.01		0.31	

جدول ۳- مشخصات آماری مدل‌های منتخب برای مقادیر ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌های استخراجی

Table 3- Statistical characteristics of selected models for the values of TPC, reducing power, stability power, radical scavenging ability, and total flavonoid compounds of extracts

	ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	فلاونوئیدهای کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)
انحراف معیار	58.88873	10.34791	0.212709	35.90304	28.63
میانگین	2305.616	335.7695	6.9255	2721.284	215.80
ضریب تغییرات	2.554144	3.081848	3.071393	1.319342	13.27
R^2	0.98468	0.946444	0.965542	0.995109	0.70
Adj. R^2	0.970891	0.898244	0.934531	0.990708	0.68

مدل مناسب با توجه به معنی دار بودن آزمون F ($P<0.05$) و معنی دار نبودن مقدار فقدان برازش[۱۲] ($P>0.05$) در مورد آن و همچنین مقادیر R^2، R^2adj و ضریب تغییرات[۱۳] (CV) انتخاب شد. معادله کلی چندجمله‌ای درجه دوم به‌صورت زیر قابل ارائه می‌باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3}\beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3}\beta_{ii}.x_i^2 + \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=2}^{3}\beta_{ij}x_i.x_j \quad (۲)$$

که در آن Y، مقدار پاسخ به‌دست آمده، β_0، β_i، β_{ii} و β_{ij}، به‌ترتیب ضرایب معادله رگرسیونی برای عرض از مبدا، حالت خطی، درجه دوم و اثرمتقابل متغیرهای مستقل دما، فشار استخراج و نسبت اختلاط می باشد. با توجه به جدول ۳ و مقادیر بالای ضریب تبیین به‌دست آمده، شاهد برازش مناسب داده‌ها توسط مدل‌های انتخابی بودیم. مقدار ضریب تبیین برای ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی روغن و قدرت رادیکال گیرندگی، به‌ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۵، ۰/۹۶ و ۰/۹۹ بود. ضریب تغییرات بسیار پایین نیز دلیل دیگری بر این مدعاست که مدل چندجمله‌ای درجه دوم، برازش مناسبی از داده‌های حاصل از کار آزمایشگاهی داشت. پارامترهای موثر در مدل‌های به‌دست آمده با توجه به آنالیز واریانس انجام شده و جدول آنالیز واریانس (ANOVA)، انتخاب و در مدل نهایی جایگذاری شدند.

بررسی میزان ترکیبات فنولی کل

با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ۲) تمامی پارامترهای خطی و درجه دوم دما، فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال، به همراه پارامتر اثرمتقابل فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال، در معادله برازش داده شده برای مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته، دارای اثر معنی‌داری بودند ($P<0.05$) (جدول ۲). مدل برازش داده شده با توجه به آنالیز آماری انجام شده مطابق با معادله ۳ می‌باشد:

$$Y= 2330.26+ 9764b_1+ 27.5b_2+ 422.02b_3- 126.68b_{11}+ 216.68b_{22}- 139.27b_{33}+ 144.20b_{23} \quad (۳)$$

بررسی تغییرات دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد بر میزان ترکیبات فنولی کل نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته افزایش یافت و با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، میزان ترکیبات فنولی کاهش یافت. با افزایش فشار از ۱۰ تا ۳۰ بار، میزان ترکیبات فنولی کاهش کمی داشت اما با افزایش فشار از ۳۰ تا ۵۰ بار، میزان ترکیبات فنولی افزایش داشت (شکل ۱-الف).

ثابت دی‌الکتریک آب در دماهای ۸۰، ۱۱۰ و ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب ۸۱، ۵۳ و ۴۲ اپسیلون (ε) می‌باشد (Kerr and Lide, 2000) و این باعث می‌شود که با افزایش دما تا دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، انحلال ترکیبات فنولی موجود در پوست پسته که خاصیت نیمه قطبی دارند، در آب مادون بحرانی با دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد.

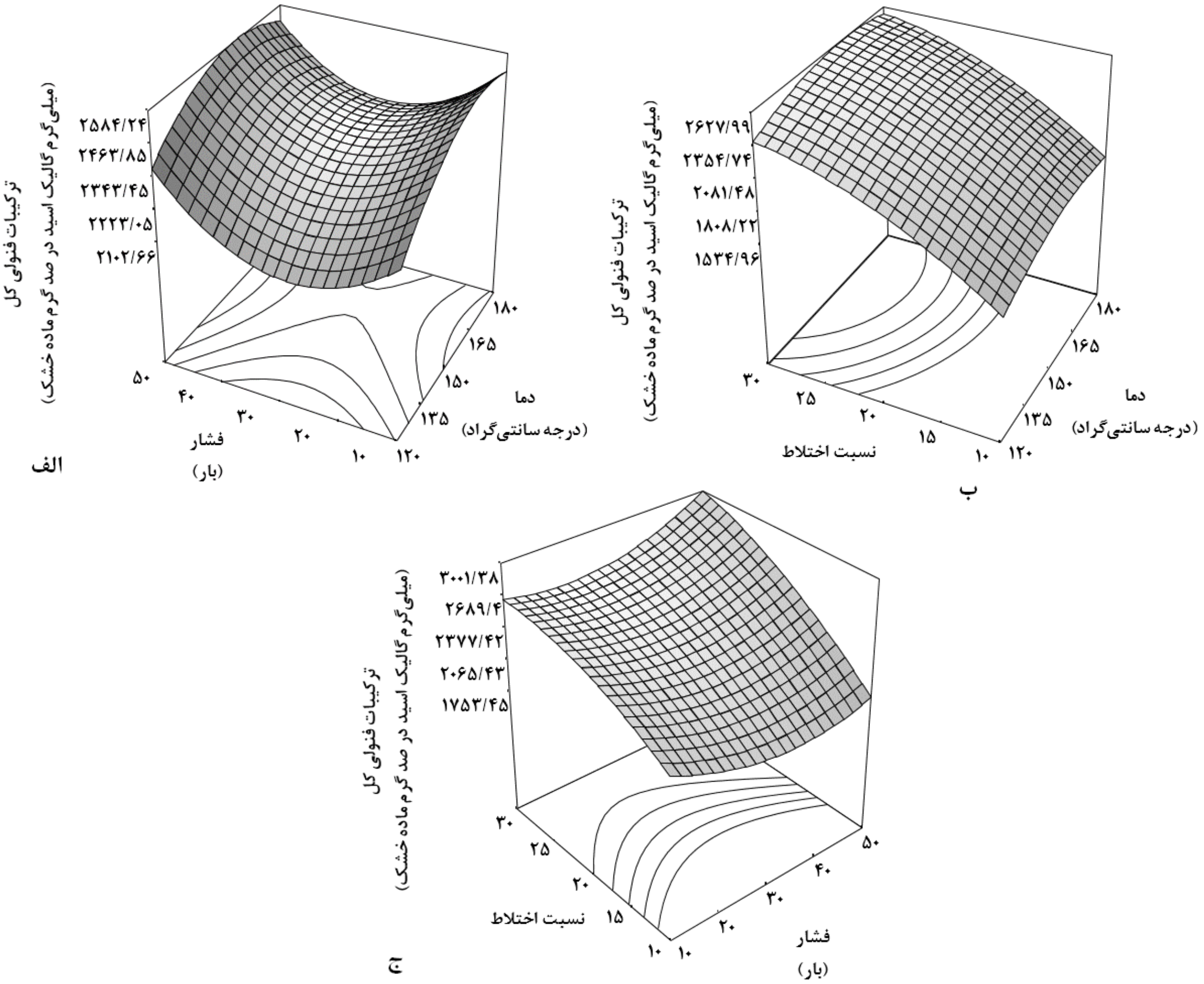
بررسی اثر متقابل دما و نسبت اختلاط نمونه و حلال، بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافت و با افزایش نسبت اختلاط ۱:۱۰ تا ۱:۳۰، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده به‌صورت محسوسی افزایش داشت. با توجه به شکل ۱ب میزان اثر بخشی نسبت اختلاط حلال و نمونه در افزایش مقدار ترکیبات فنولی بسیار بیشتر از اثر افزایش دما بوده است. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط He و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت که بیان نمودند با افزایش نسبت

1 Lack of fit

2 Correlation value

اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۴۰، میزان ترکیبات فنولی افزایش یافت (He *et al*., 2011).

افزایش دمای آب موجب کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی آب شده و منجر به افزایش نرخ نفوذ و بالا رفتن میزان انتقال جرم می‌شود (Ramos *et al*., 2002). با بررسی اثر متقابل فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال مشخص شد که در اینجا نیز اثر افزایش نسبت اختلاط بسیار بیشتر از اثر افزایش فشار در استخراج ترکیبات فنولی از پوست پسته بوده است. با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۳۰، میزان ترکیبات فنولی همواره افزایش داشته است. افزایش فشار هرچند که باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولی شد اما افزایش چشمگیر و محسوسی نبوده است (شکل ۱ج). هرچند که افزایش دما باعث نرم شدن بافت مواد می‌شود اما در هم‌گسیختگی بین ترکیبات فنولی و پلی ساکاریدها یا پروتئین‌ها باعث کاهش میزان ترکیبات فنولی در دماهای بالاتر از ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد شده است (Shi *et al*., 2003). همچنین افزایش احتمال از هم گسیختگی دمایی ترکیبات فنولی در دماهای بالاتر از ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد نیز ممکن است از دلایل کاهش میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی در دماهای ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد باشد (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al*., 2016).



شکل ۱- اثر متقابل پارامترهای دما – فشار (الف)، دما– نسبت اختلاط (ب) و فشار– نسبت اختلاط (ج) بر مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 1. Interaction of temperature-pressure (a), temperature-mixing ratio (b) and pressure-mixing ratio (c) on the TPC of pistachio hull extracts by subcritical water.

نتایج این مطالعه با نتایج به‌دست آمده به‌وسیله Ahmadian-Kouchaksaraie و همکاران (۲۰۱۶) که روی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از گلبرگ زعفران به‌وسیله سیال مادون بحرانی آب مطالعه نمودند، مطابقت داشت. بیشترین میزان ترکیبات فنولی از گلبرگ

زعفران در دمای ۱۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al.*, 2016). نتایج مشابهی نیز در استخراج ترکیبات فنولی از برگ‌های سنجد به‌دست آمد که در آن بهترین دما برای استخراج ترکیبات فنولی، دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Kumar *et al.*, 2011).

از طرف دیگر دمای بهینه استخراج ترکیبات فنولی، با توجه به نوع ماده اولیه و بافت آن متغیر می‌باشد. به‌عنوان مثال بیشترین میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از دانه انار به‌وسیله آب مادون بحرانی، در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد (He *et al*., 2011). Rajaei و همکاران (۲۰۱۰) بیان نمودند که بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از پوسته پسته به‌روش سنتی، آب می‌باشد که بیشترین مقدار ترکیبات فنولی را به میزان ۵۰ میلی‌گرم ترکیب فنولی در هر گرم ماده خشک توانستند با استفاده از آب استخراج نمایند (Rajaei *et al*., 2010).

بررسی قدرت احیاکنندگی آهن

مدل برازش داده شده با استفاده از داده‌های حاصل از کار آزمایشگاهی برای قدرت احیاکنندگی آهن، توسط عصاره‌های استخراج شده، مطابق با رابطه ۴ می‌باشد. بیشترین اثر در این مدل مربوط به پارامتر درجه دوم دما و کمترین اثر به پارامتر اثر متقابل دما و نسبت اختلاط مربوط بود.

$$Y= 341.43- 21.55b_1- 11.63b_2+ 11.74b_3- 59.70b_{11}+ 39.97b_{33}+ 9.01b_{13} \quad (۴)$$

یکی از خواص آنتی‌اکسیدانی که معمولا مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، قدرت احیا یون‌های آهن سه ظرفیتی (Fe^{+3}) به آهن دو ظرفیتی (Fe^{+2}) توسط عصاره‌های استخراجی می‌باشد. در این روش یون‌های آهن در حضور معرف مورد استفاده رنگ سبز ایجاد می‌نماید (Jayaprakasha *et al*., 2001). افزایش فشار از ۱۰ تا ۵۰ بار تغییر چندانی در قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست سبز پسته نداشت. اما افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش قدرت احیاکنندگی و با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، قدرت احیاکنندگی به‌صورت چشمگیری کاهش یافت. این نتایج با تغییرات میزان ترکیبات فنولی مطابقت داشت در مطالعه انجام شده توسط Pintoa و همکاران (۲۰۲۱) عنوان شد پارامتر دما موثرترین عامل در تغییر قدرت احیاکنندگی آهن، توسط عصاره‌های استخراجی بود (Pintoa et al., 2021).

با توجه به شکل ۲ الف، با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۲۰ قدرت احیاکنندگی کاهش و با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۲۰ تا ۱:۳۰ شاهد افزایش قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی بودیم. این روند در تمامی دماهای مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت اختلاط ۱:۳۰ مشاهده شد.

با بررسی اثر متقابل نسبت اختلاط و فشار بر قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی شاهد اثر ناچیز متغیر فشار در قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته بودیم. این اثر در تمامی نسبت اختلاط‌های مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۲ ج). مقادیر به‌دست آمده برای قدرت احیاکنندگی آهن به‌وسیله عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی، با قدرت احیاکنندگی آهن توسط اسید آسکوربیک و BHT نیز مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که اختلاف چندانی میان قدرت احیاکنندگی عصاره بهینه و آنتی اکسیدان BHT وجود نداشت و بالاترین قدرت احیاکنندگی آهن به اسید آسکوربیک مربوط بود (جدول ۵). Rodrigues و همکاران (۲۰۲۰) که بر روی استخراج ترکیبات زیست فعال گیاه چایا با استفاده از روش مادون بحرانی و مایکروویو مطالعه نمودند بیان داشتند که عصاره به‌دست آمده از روش مایکروویو، قدرت بیشتری در جذب یون‌های آهن دارا بودند (Rodrigues et al., 2020).

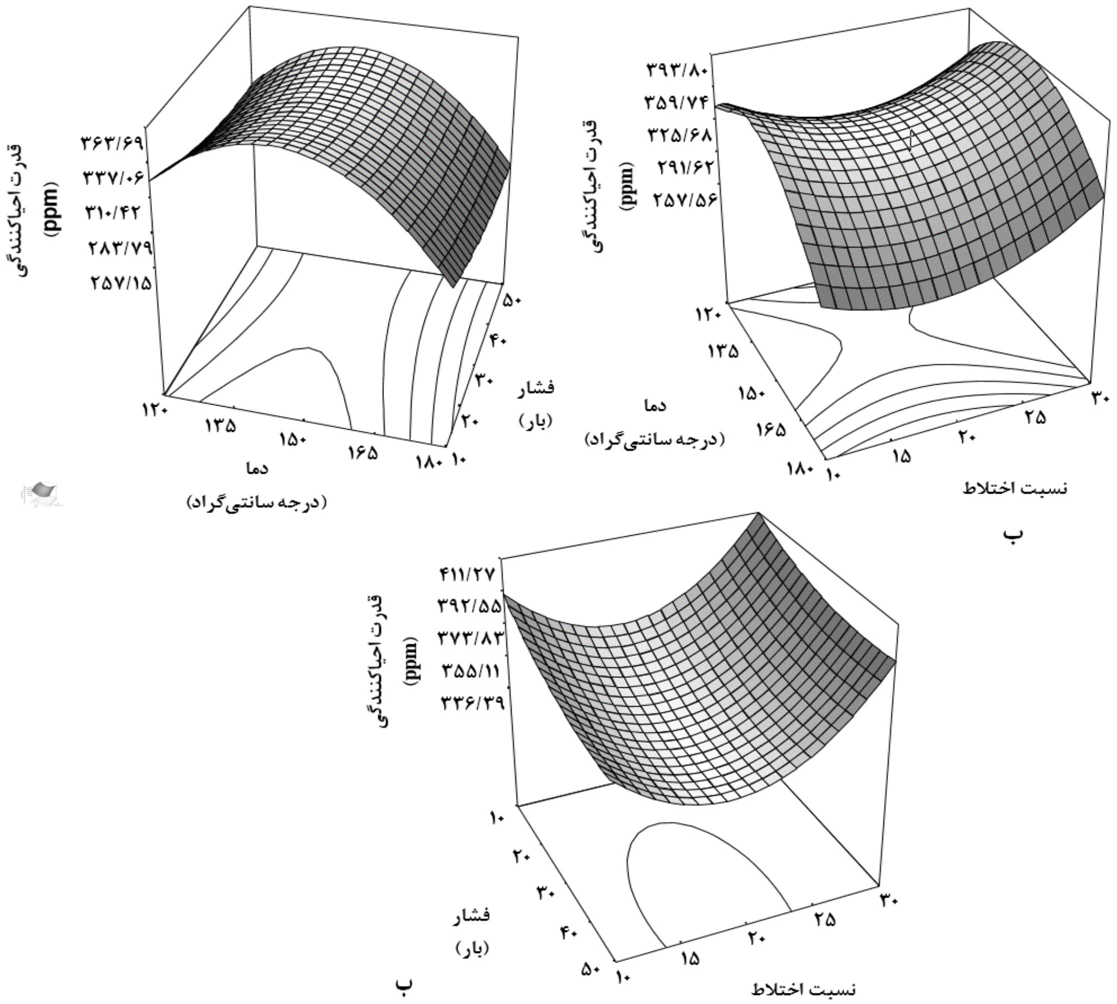
بررسی قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی

در مدل برازش داده شده برای قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته با استفاده از آب مادون بحرانی، پارامترهای درجه دوم نسبت اختلاط نمونه و حلال و اثر متقابل دما و فشار، تاثیر معنی داری در پیش بینی داده‌های به‌دست آمده نداشتند و از طرفی بیشترین تاثیر به متغیر خطی دما و کمترین اثر به پارامتر اثر متقابل دما و نسبت اختلاط ارتباط داشت.

$$Y= 6.94+ 0.99b_1- 0.37b_2- 0.36b_3- 0.02b_{11}+ 0.17b_{22}- 0.18b_{13}+ 0.05b_{23} \quad (۵)$$

در این روش از شرایط تشدید شده اکسایش مانند دمای بالا و جریان هوا استفاده می‌شود. اکسایش نمونه‌ها در ظروف مخصوص و در محفظه مجهز به گرم کن انجام شد. در این حال جریانی از هوا از محل واکنش اکسایش به ظرف محتوی آب، هدایت و ضریب هدایت الکتریکی آب بر حسب میکروزیمنس بر سانتیمتر (µs/cm) محاسبه می‌گردد. افزایش هدایت الکتریکی آب به‌عنوان شاخصی از پیشرفت اکسایش در نظر گرفته می‌شود. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، در تمامی فشارهای مورد مطالعه، قدرت پایدارکنندگی عصاره در روغن سویا افزایش یافت. با بررسی متغیر فشار، مشخص شد که در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، با افزایش فشار، قدرت پایدار کنندگی کاهش داشت اما در دماهای بالا (۱۸۰ درجه سانتی‌گراد) افزایش فشار از ۱۰ تا ۵۰ بار، تغییر چندانی در قدرت پایدارکنندگی

عصاره‌ها ایجاد نکرد. به‌نظر می‌رسد در این حالت متغیر اصلی موثر در فرایند استخراج، تغییرات دما بوده است.



شکل ۲- اثر متقابل پارامترهای دما – فشار (الف)، دما– نسبت اختلاط (ب) و فشار– نسبت اختلاط (ج) بر قدرت احیاکنندگی آهن به‌وسیله عصاره های استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 2. Interaction of temperature-pressure (a), temperature-mixing ratio (b) and pressure-mixing ratio (c) parameters on the reduction power of extracts from pistachio hull by subcritical water.

با بررسی اثر متقابل دما و نسبت اختلاط در مورد قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی، مشخص شد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، در تمامی نسبت اختلاط‌های مورد مطالعه، قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی افزایش یافت ولی با افزایش فشار از ۱۰ تا ۵۰ بار قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی کاهش یافت با این توضیح که شدت کاهش قدرت پایدارکنندگی روغن با افزایش فشار، در دماهای بالاتر، بیشتر بوده است.

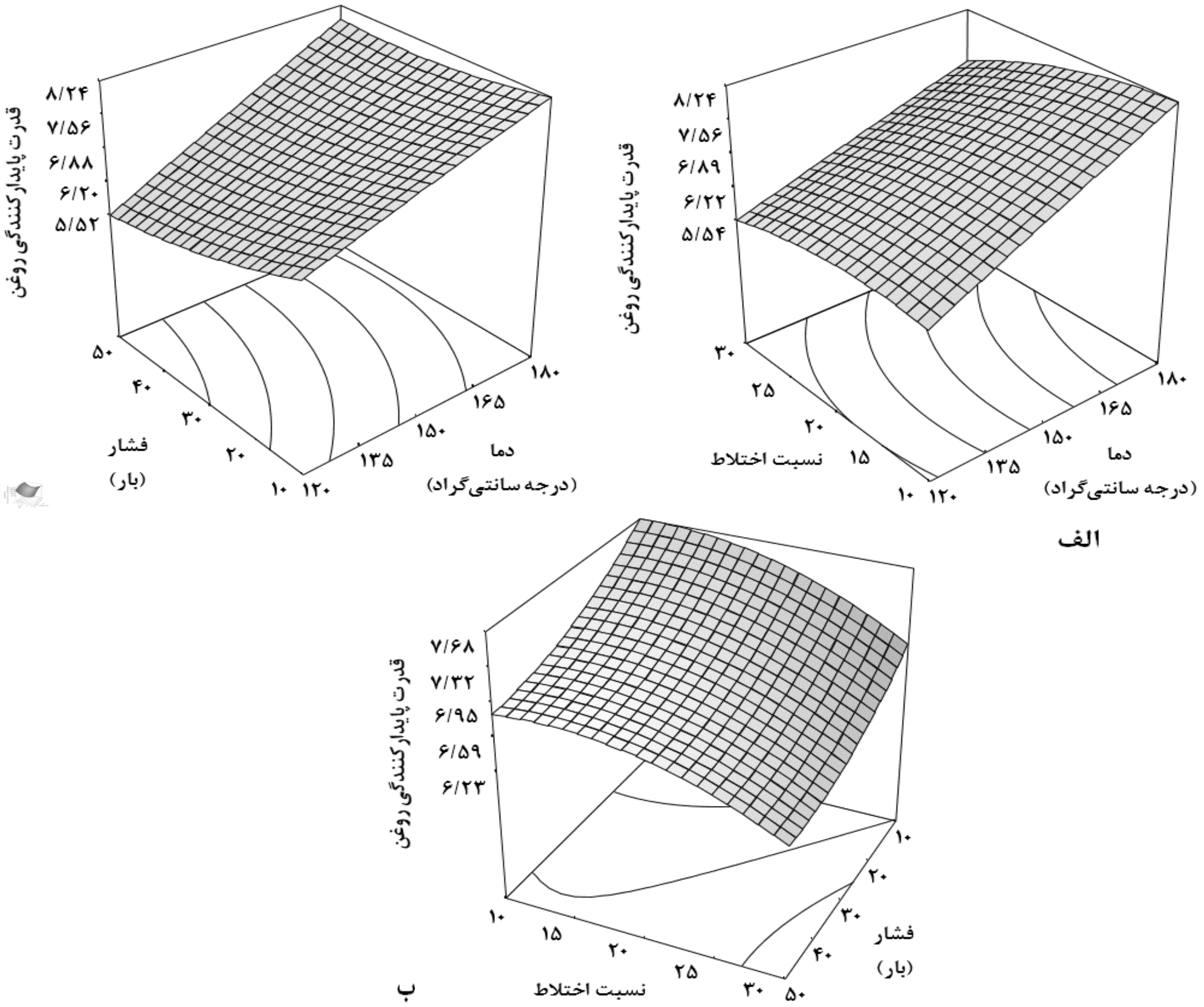
نتایج نشان داد که با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۳۰، در تمامی فشارهای مورد مطالعه، قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته کاهش یافت. این امر به دلیل افزایش استخراج ترکیبات غیرموثر در قدرت پایدارکنندگی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد با افزایش نسبت اختلاط نمونه و حلال در مواردی ترکیباتی استخراج شده اند که باعث کاهش قدرت پایدار کنندگی روغن سویا بودند.

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه که باعث پایداری روغن سویای فاقد آنتی‌اکسیدان تلقیح شده با عصاره‌های استخراج شده توسط آب مادون بحرانی از پوست پسته در رنج بین ۵/۰۸ تا ۸/۶۹ ساعت بود در مقایسه با نتایج Chandrika و همکاران (۲۰۰۷) روی اثر افزایش عصاره‌های استخراج شده از گندم نانوایی و گندم درم بر چند نوع روغن

خوراکی مطالعه نمودند، حاکی از اثر بسیار بیشتر عصاره‌های استخراجی از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی بود (Chandrika *et al.*, 2007).

Mrabet و همکاران (۲۰۱۷) قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از چند واریته خرما را مورد مطالعه قرار دادند، بیان نمودند که افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره به روغن سویا، باعث افزایش پایداری آن به میزان ۱/۷۱ ساعت شده بود (Mrabet *et al.*, 2017). Yang و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند که با افزودن عصاره رزماری به مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به روغن‌های سویا، بذرکتان و روغن برنج، باعث پایداری این روغن‌ها تا به‌ترتیب ۳/۴، ۳/۳۵ و ۶/۲۲ ساعت می گردد که در مقایسه با مقادیر به‌دست آمده در این مطالعه که با افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست پسته به روغن سویا، حاصل شد بیانگر اثر بیشتر ترکیبات به‌دست آمده از پوست پسته به‌وسیله سیال مادون بحرانی آب می‌باشد (Yang *et al.*, 2016).

در مقایسه با نتایج عصاره بهینه شده و قدرت پایدارکنندگی BHT و ویتامین E، مشخص شد که قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی مشابهت بیشتری به قدرت پایدارکنندگی آلفاتوکوفرول، نسبت به BHT دارد (جدول ۵).



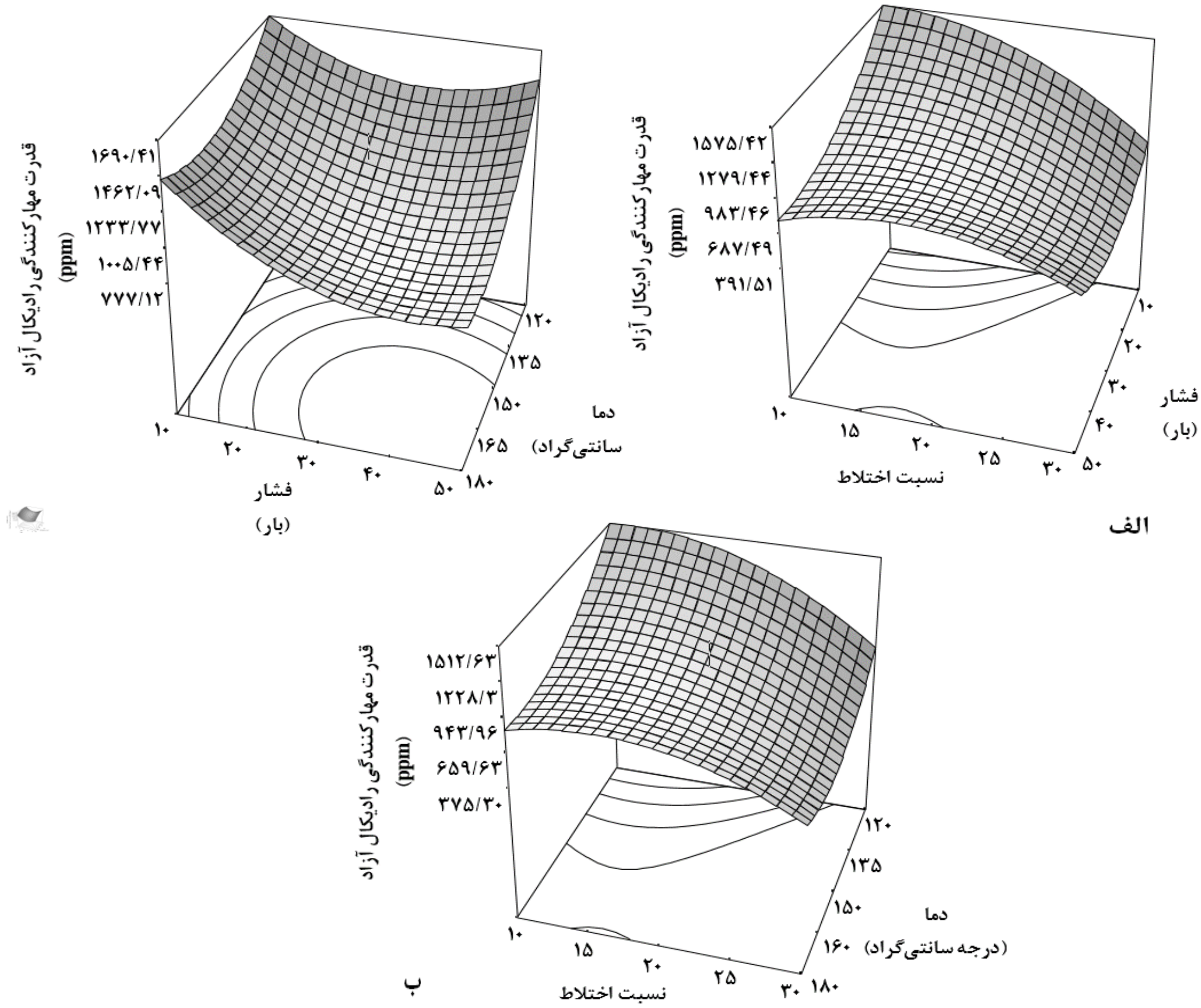
شکل ۳- اثر متقابل پارامترهای دما- فشار (الف)، دما- نسبت اختلاط (ب) و فشار- نسبت اختلاط (ج) بر قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی در محیط روغن سویا.

Fig. 3. Interaction of temperature-pressure (a), temperature-mixing ratio (b) and pressure-mixing ratio (c) on the stability power of pistachio hull extracts by subcritical water in soybean oil.

بررسی قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراجی

تمامی پارامترهای خطی، درجه دوم و اثرمتقابل در مدل برازش شده برای قدرت جذب رادیکال‌های آزاد توسط عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته، دارای اثر معنی داری بودند ($P<0.05$). در این میان بیشترین اثر به پارامتر خطی نسبت اختلاط نمونه و حلال و کمترین اثر نیز به پارامتر اثر متقابل دما و نسبت اختلاط ارتباط داشت.

$$y= 2601.27- 224.10b_1- 201.00b_2- 280.81b_3+ 227.74b_{11}+ 241.23b_{22}- 228.94b_{33}- 104.93b_{12}+ 101.73b_{13}+ 180.04b_{23} \quad (۶)$$



شکل ٤- اثر متقابل پارامترهای دما- فشار (الف)، فشار- نسبت اختلاط (ب) و دما- نسبت اختلاط (ج) بر مقدار قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH توسط ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 4. Interaction of temperature-pressure (a), pressure-mixing ratio (b) and temperature-mixing ratio (c) on the amount of DPPH free radical scavenging ability by phenolic compounds extracted from pistachio hull by subcritical water.

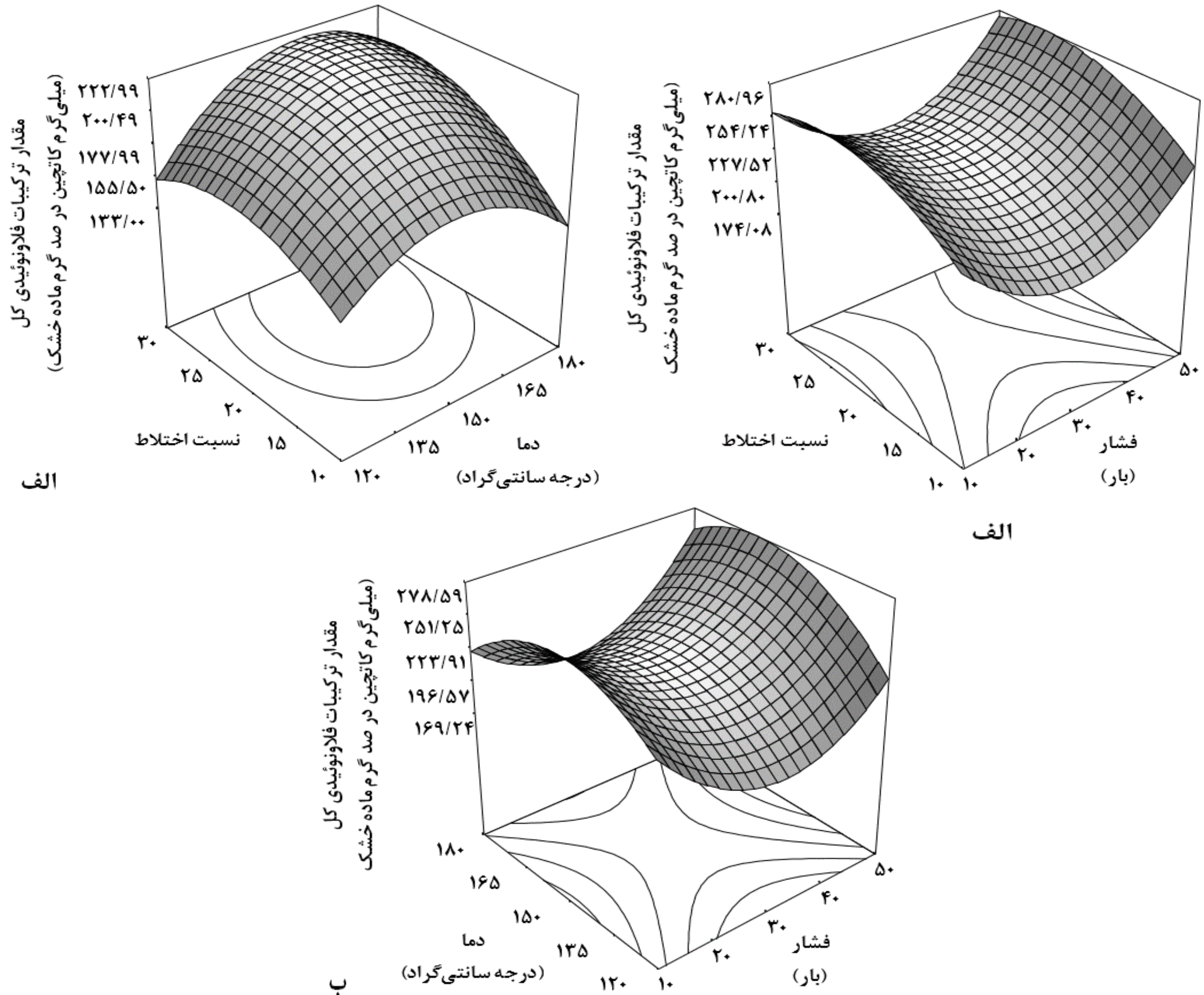
رادیکال DPPH یک ترکیب معمول در ارزیابی قدرت جذب رادیکال‌های آزاد به‌وسیله پلی‌ساکاریدها می‌باشد (Tian *et al*., 2012). در آزمون جذب و غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد DPPH، آنتی اکسیدان‌ها رنگ بنفش تیره پایدار رادیکال DPPH را به زرد کمرنگ دی‌فنیل پیکریل هیدرازین تبدیل می‌کنند. تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، به ظرفیت اشتراک گذاری هیدروژن توسط آن‌ها مربوط می‌شود (Chen *et al*., 2008).

قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH به‌وسیله عصاره‌های استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با استفاده از پارامتر IC_{50} مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش دمای استخراج از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده کاهش یافته است. این روند در تمامی فشارهای مورد مطالعه مشاهده شد با این تفاوت که شدت کاهش قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌ها در فشارهای بالا بیشتر بوده است.

این امر به خاطر از بین رفتن ترکیبات با قدرت رادیکال گیرندگی بالا و در عوض ایجاد ترکیبات غیر موثر در قدرت رادیکال گیرندگی بوده است. با توجه به شکل ۴ ب می‌توان گفت که با افزایش نسبت اختلاط قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده کاهش یافت. این روند در تمامی دماهای مورد مطالعه مشاهده شد. آنچه که مشخص است اینکه ظرفیت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH منحصرا به یک گروه منفرد از ترکیبات آنتی اکسیدانی ارتباط ندارد، بلکه در حقیقت خاصیت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراجی به مجموعه‌ای از ترکیبات استخراج شده مربوط می‌باشد که منجر به بروز خاصیت جذب رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Thoo *et al*., 2010). با توجه به جدول ۵ می‌توان بیان نمود که در مجموع قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته، در مقایسه با سایر خواص آنتی‌اکسیدانی (قدرت پایدارکنندگی و قدرت احیاکنندگی) از قدرت کمتری برخوردار بوده‌اند. با بررسی اثر متقابل فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال مشخص شد که بیشترین قدرت رادیکال گیرندگی در فشار ۱۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۱۰ مشاهده شد و کمترین قدرت رادیکال گیرندگی در فشار ۵۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۳۰ گزارش شد.

بررسی مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل

در مورد تاثیر پارامترهای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست پسته که توسط آب مادون بحرانی انجام شد، جدول ۲ نشان داد که پارامترهای خطی فشار، درجه دوم فشار و همچنین پارامترهای اثرمتقابل فشار با دما و نسبت اختلاط، تاثیر معنی‌داری در معادله برازش داده شده برای ترکیبات فلاونوئیدی کل نداشته و از معادله حذف شدند.



شکل ۵- اثر متقابل پارامترهای دما- نسبت اختلاط (الف)، فشار- نسبت اختلاط (ب) و فشار- دما (ج) بر مقدار فلاونوئیدی کل استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 5. Interaction of temperature-mixing ratio (a), pressure-mixing ratio (b) and pressure-temperature (c) on the total flavonoid content extracted from pistachio hull by subcritical water.

از اینرو معادله نهایی مطابق با فرمول زیر تعریف گردید:

$$Y= 223.73+ 9.58b_1+ 20.05b_3- 40.45b_{11}- 25.45b_{33} \quad (7)$$

در میان پارامترهای معنی‌دار، پارامتر درجه دوم دما بیشترین تاثیر را در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی دارا بود و کمترین اثر به پارامتر خطی دما مربوط بود (جدول ۲).

بررسی تغییرات مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های استخراجی از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی حاکی از آن بود که مقدار این ترکیبات و میزان تغییرات ترکیبات فنولی، با یکدیگر همپوشانی داشته و از یک الگوی کلی طبعیت می‌نمودند. این تغییرات در مورد تیمار دما و فشار از نمود بیشتری برخوردار بود بدین‌صورت که تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با تغییرات بیشتری همراه بود. به‌طورکلی مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش و پس از آن به دلیل تاثیر مخرب دما بر ساختار ترکیبات فلاونوئیدی، مقدار این ترکیبات کاهش پیدا کرد (شکل ۵، الف و ج). Shi و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی استخراج ترکیبات پلی فنولی از دانه انگور مطالعه نمودند و بیان داشتند که افزایش دما در روش استخراج مادون بحرانی آب در دماهای بالاتر از ۱۶۰–۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، باعث تخریب و یا درهم‌گسیختگی دمایی این ترکیبات می‌شود (Shi et al., 2003).

بهترین نسبت اختلاط نمونه و حلال در روش مادون بحرانی برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی، نسبت اختلاط ۱:۲۰ بود و با کاهش نسبت اختلاط و استفاده از مقدار کمتری حلال در برابر نمونه، استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از نمونه به صورت کامل انجام نشد و در نسبت اختلاط‌های بالا (۱:۳۰)، به دلیل وجود و حضور مقدار حلال بیشتر نسبت به نمونه، علاوه بر ترکیبات فلاونوئیدی، سایر ترکیبات ناخواسته نیز استخراج و وارد حلال شدند (شکل ۵، الف و ب). مطبق با شکل ۵، علیرغم اینکه در فشارهای بالاتر و کمتر از ۳۰ بار، مقدار استخراج ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافت اما با توجه به نتایج ارائه شده در جدول آنالیز واریانس (جدول ۱)، این پارامتر تاثیر معنی‌داری در تغییر ترکیبات فلاونوئیدی نداشت. محققان در سال ۲۰۲۰ که بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست مرکبات (*Citrus unshiu*) توسط آب مادون بحرانی مطالعه نمودند اظهار داشتند که در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، تجزیه دمایی این ترکیبات رخ داده است (Kim and Lim, 2020). Ko و همکاران در سال ۲۰۱۶ با مطالعه بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست میوه *Satsuma mandarin*، به این نتیجه رسیدند که دمای بهینه برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی، دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Ko et al., 2016).

جدول ٤- بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره از پوست پسته توسط سیال مادون بحرانی آب

Table 4- Optimization of pistachio hull extraction conditions by subcritical water

دما (◦C)	فشار (bar)	نسبت اختلاط نمونه و حلال	ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	ترکیبات فلاونوئیدی کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)	درجه مطلوبیت (٪)
147	10	19	2497.8	362.94	7.44	1370.77	267.99	0.70

جدول ٥- مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره بهینه استخراج شده و خواص آنتی اکسیدانی BHT، اسید آسکوربیک و آلفاتوکفرول

Table 5- Comparison of antioxidant properties of optimized extract with antioxidant properties of BHT, ascorbic acid and alpha-tocopherol

	قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm))	قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)
عصاره بهینه استخراج توسط سیال مادون بحرانی آب	304.51	7.45	1632.29
BHT	177.89	7.81	484.55
اسید آسکوربیک	24.84	–	187.88
آلفا توکفرول	-	5.33	-

بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنولی از پوست پسته

بهینه‌سازی فرایند عصاره‌گیری از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی، به‌منظور رسیدن به حداکثر ترکیبات فنولی، حداکثر قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن، بیشترین قدرت پایدارکنندگی روغن سویا، بالاترین میزان قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH و حداکثر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی، با در نظر گرفتن استفاده از دماهای پایین‌تر و کاربرد فشارهای پایین‌تر (به‌منظور صرفه جویی در انرژی) و همچنین استفاده از نسبت اختلاط‌های کمتر (به‌منظور به کار بردن مواد اولیه کمتر) انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از دمای ۱۴۳ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۱۹، منجر به رسیدن اهداف تعیین شده گردید (جدول ۴).

نتیجه‌گیری

عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته توسط سیال مادون بحرانی آب، دارای محتوای نسبتا بالایی از ترکیبات فنولی بودند و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT، از قدرت احیاکنندگی خوبی برخوردار بودند. همچنین عصاره‌های به‌دست آمده از پوست پسته از لحاظ قدرت رادیکال گیرندگی نیز نزدیکی بیشتری با BHT، نسبت به اسید آسکوربیک داشتند. در رابطه با قدرت پایدارکنندگی روغن سویا نیز می‌توان بیان نمود کهBHT نسبت به آلفاتوکفرول، قابلیت بیشتری در پایدارکردن روغن سویا دارد و قدرت آن مشابهت بیشتری با عصاره‌های به‌دست آمده از پوست پسته دارد.

منابع

1. Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R. and Najaf Najafi, M. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36: 234–244. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.005
2. Akhtar, M. J., Ahamed, M. and Alhadlaq, H. A. (2017). Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders. *BBA - General Subjects*, 1861: 802-813. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.01.018
3. Al-Dabbas, M. M., Suganuma, T., Kitahara, K., Xing Hou, D. and Fujii, M. (2006). Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of Varthemiaiphionoides Boiss. *Extracts Journal of Ethnopharmacology*, 108:287-293. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.006
4. Ayala, R. S. and Luke de castro, M. D. (2001). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75:109–113. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00212-6
5. Braud, L., Battault, S., Meyer, G., Nascimento, A., Gaillard, S., de Sousa, G., Rahmani, R., Riva, C., Armand, M., Maixent, J. M. and Reboul, C. (2017). Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 40: 95-104. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.012
6. Chandrika, M., Pathirana, L. andShahidi, F. (2007). The antioxidant potential of milling fractions from breadwheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45: 238–247. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.08.007
7. Chen, Y., Xie, M. Y., Nie, S. P., Li, C., and Wang, Y. X. (2008). Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of Ganodermaatrum. *Food Chemistry*, 107 (1): 231–241. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.021
8. Ertiken, C. and Yaldiz, O. (2004). Drying of eggplant and selection of a suitable thin layer drying model. *Journal of Food Engineering*, 63:349–359. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.08.007
9. Fregaa, N., Mozzona, M. and Lerckerb, G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *JAOCS*, 76, 325–329. https://doi.org/10.1007/s11746-999-0239-4
10. He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Z., Novak, Z. and Gao, Y. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS$^{\bullet+}$ assay. *Food and Bioproducts Processing*, 243: 1-9. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.03.003
11. Horchani, H., Ben Salem, N., Zarai, Z., Sayari, A., Gargouri, Y. and Chaâbouni, M. (2010). Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized Staphylococcus aureus lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 101: 2809–2817. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.082
12. Jayaprakasha, G., Singh, R., and Sakariah, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitisvinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73 (3): 285–290. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00298-3
13. Kerr, J., andLide, D. (2000). CRC handbook of chemistry and physics 1999–2000 (81st ed.). *Boca Raton, FL, USA:* CRC Press.

14. Kim, D. S., Lim, S. B. (2020). Kinetic study of subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel. Separation and Purification Technology, 1-9 .
15. Ko, M.J., Kwon, H.L., Chung, M.S. (2016). Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu Markovich*) peel. Innovative Food Science and Emerging Technologies, DOI:10.1016/j.ifset.2016.10.00
16. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. (2004). Use of different method for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85:633-640. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024
17. Kumar, M. Y., Dutta, R., Prasad, D., and Misra, K. (2011). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(3): 1309–1316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.088
18. Maghsoudlou, E., Esmaeilzade Kenari, R. and Raftani Amiri, Z. (2016). The effects of extraction technique on phenolic compounds extracted from fig (*Ficuscarica*) pulp and skin. *Iranian Food Science and Technology* Research Journal, 11 (6): 758-769.
19. Mohammadi, M., Ghorbani, M., Beigbabaei, A., Yeganehzad, S., Sadeghi-Mahoonak, A. 2019. Investigation effects of extracted compounds from shell and cluster of pistachio nut on the inactivation of free radicals, Heliyon, 5: e02438. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02438
20. Mrabet, A., García-Borrego, A., Jiménez-Araujo, A., Fernández-Bolaños, J., Sindic, M. and Rodríguez-Gutiérrez, M. 2017. Phenolic extracts obtained from thermally treated secondary varieties of dates: Antimicrobial and antioxidant properties. LWT- *Food Science and Technology*, 79: 416-422. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.064
21. Pintoa, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F. (2021). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry, 334*, 127521. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521
22. Rajaei, A., Barzegar, M., MohabatiMobarez, A., Sahari, M. A. and Hamidi Esfahani, Z. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachiavera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 107–112. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.023
23. Ramos, L., Kristenson, E. and Brinkman, U. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1): 3–29. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01336-5
24. Rodrigues, L.G.G., Mazzutti, S., Siddique, I., da Silva, M., Vitali, L., Ferreira, S.R.S. (2020). Subcritical Water Extraction and Microwave-Assisted Extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill.), *The Journal of Supercritical Fluids*, https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104976
25. Shaddel, R., Maskooki, A., Haddad-Khodaparast, M. H., Azadmard-Damirchi, S., Mohamadi, M. and Fathi-Achachlouei, B. (2014). Optimization of Extraction Process of Bioactive Compounds from Bene Hull Using Subcritical Water. *Food Sci. Biotechnol*, 23(5): 1459-1468. https://doi.org/10.1007/s10068-014-0200-7
26. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., and Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food Agriculture & Environment*, 1(2): 42–47. https://doi.org/10.1007/s10068-014-0200-7
27. Talebi, S., Alizadeh, M., Ramezanpour, S. and Ghasemnajad, A. (2020). The antioxidant properties of some endemic barberry genotypes of Iran. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 51 (1): 91-107.
28. Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C.W. and Tan, C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morindacitrifolia*). *Food Chemistry*, 120 (1): 290–295. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064
29. Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C. and Martin Lo, Y. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricusbisporus*). *Carbohydrate Polymers*, 88: 522– 529. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.042
30. Tilahun, A. and Chun, B. S. (2017). Molecular modification of native coffee polysaccharide using subcritical water treatment: Structural characterization, antioxidant, and DNA protecting activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99: 555-562. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.034
31. USDA,http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome.
32. Yang, Y., Song, X., Sui, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y. and Jiang, L. (2016). Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 80: 141–147. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.044